



# MutaCHIP<sup>®</sup> 5-FU

DNA-Macroarray Kit zur Untersuchung von Mutationen des Dihydropyrimidin-Dehydrogenase-Gens



Nur für in-vitro Diagnostik



KF391006



10



KF390006



20



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany  
[www.immundiagnostik.com](http://www.immundiagnostik.com)  
[info@immundiagnostik.com](mailto:info@immundiagnostik.com)

Tel.: +49 (0)6251/ 701900  
 Fax: +49 (0)6251/ 849430

# Inhaltsverzeichnis

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1 Verwendungszweck</b>                | <b>3</b>  |
| <b>2 Einleitung</b>                      | <b>3</b>  |
| <b>3 Testprinzip</b>                     | <b>4</b>  |
| <b>4 Kitbestandteile</b>                 | <b>4</b>  |
| <b>5 Erforderliche Materialien</b>       | <b>5</b>  |
| <b>6 Lagerung und Haltbarkeit</b>        | <b>5</b>  |
| <b>7 Arbeitsbedingungen</b>              | <b>5</b>  |
| <b>8 Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen</b> | <b>6</b>  |
| <b>9 Probengewinnung</b>                 | <b>6</b>  |
| <b>10 Testdurchführung</b>               | <b>7</b>  |
| 1 PCR Produktherstellung.....            | 7         |
| 2 PCR Protokoll.....                     | 8         |
| 3 MutaChip Protokoll.....                | 9         |
| <b>11 Auswertung</b>                     | <b>11</b> |
| <b>12 Troubleshooting</b>                | <b>15</b> |

# 1 Verwendungszweck

Das MutaCHIP 5-FU® Kit ist ein molekularbiologischer Test zur Untersuchung von Mutationen des Dihydropyrimidin-Dehydrogenase-Gens (DPYD) aus genomischer DNA mittels MutaCHIP Technologie. Alle untersuchten Variationen stehen in Zusammenhang mit einem erhöhten Risiko für das Auftreten von schwerwiegenden Nebenwirkungen während einer 5-Fluorouracil (5-FU)-haltigen Chemotherapie. Folgende Variationen werden durch den MutaCHIP 5-FU Kit detektiert:

- DPYD\*2A
- DPYD\*3
- DPYD\*4
- DPYD\*7
- DPYD\*8
- DPYD\*10
- DPYD\*12
- DPYD\*13
- DPYD M166V
- DPYD A551T
- DPYD D949V

# 2 Einleitung

Neben Einflüssen wie Alter, Geschlecht, Ernährung und Komedikation können insbesondere genetische Faktoren die Enzymaktivität beeinflussen. Es ist bekannt, dass Patienten, die keine bzw. eine stark reduzierte Aktivität des Enzyms Dihydropyrimidin-Dehydrogenase (DPD) aufweisen, unter einer Therapie mit 5-Fluorouracil (5-FU) ein erhöhtes Risiko für das Auftreten schwerer bis tödlicher Nebenwirkungen (gemäß WHO Grad 3-4) haben. 5-FU ist ein Zytostatikum, das standardmäßig zur Therapie einer Reihe von Tumorerkrankungen eingesetzt wird. Die Untersuchung des DPYD-Gens kann helfen, das genetisch bedingte Risiko einer Nebenwirkung stark zu reduzieren bzw. zu vermeiden. Träger einer der untersuchten genetischen Varianten des DPYD Gens können somit vor Beginn einer Therapie ermittelt und ggf. mit einer alternativen Therapie oder mit deutlich reduzierter Dosierung behandelt werden. Von allen Patienten, die trotz einer genetischen Variante des DPYD-Gens mit 5-FU behandelt werden, erkranken über 40 % an schweren Nebenwirkungen (Grad 4). In vielen Fällen können 5-FU-bedingte Nebenwirkungen mit dem Vorliegen einer Mutation im DPYD-Gen erklärt werden. Die Genotypisierung kann helfen, medikamentöse Therapien individuell zu optimieren und durch unerwünschte Nebenwirkungen entstehende Kosten (verlängerter Krankenhausaufenthalt etc.) zu senken.

## Referenzen:

- Mol Cancer Ther. 2006; 5(11):2895-2904
- Clin Cancer Res. 2004; 10(17):5880-5888
- Clin Cancer Res. 2006; 12(13):3928-3934
- Pharmacogenomics. 2001; J1:65-70
- J Clin Oncol. 2008; 26(13):2130-2137

### 3 Testprinzip

Zur Analyse der Mutationen werden die relevanten Teile des *DPYD* -Gens mittels PCR amplifiziert, wobei frisch extrahierte genomische DNA des Patienten als Matrize dient. Das Amplifikationsprodukt wird anschließend auf den MutaCHIP gegeben und nach mitgeliefertem Protokoll bearbeitet. Die Analyse mittels Präzipitationsreaktion lässt eine eindeutige Genotypisierung aller auf den MutaCHIP gespotteten Allele des *DPYD*-Gens zu.

Das amplifizierte Produkt wird auf den MutaCHIP gegeben und bindet an den dort immobilisierten Sonden. Durch einen Waschschrift werden unspezifisch gebundene Fragmente wieder entfernt. Im Anschluss wird das Enzym hinzugegeben, welches an den Sonden-Fragment-Komplex bindet. Nach Zugabe des Substrats tritt eine Fällungsreaktion an den Stellen, an denen noch DNA gebunden ist, auf. Das farbige Präzipitat wird mit dem Imagereader detektiert und von der dazugehörigen Software ausgelesen und bewertet.

### 4 Kitbestandteile

Jedes Testkit enthält die folgenden Reagenzien zur Durchführung von 20 MutaCHIP 5-FU Assays, sowie eine Gebrauchsanweisung.

| Bezeichnung                   | Gefäßgröße                           | Menge |
|-------------------------------|--------------------------------------|-------|
| Primer Mix A (grüner Deckel)  | 2 mL Schraubgefäß                    | 1     |
| Primer Mix B (gelber Deckel)  | 2 mL Schraubgefäß                    | 1     |
| Primer Mix C (roter Deckel)   | 2 mL Schraubgefäß                    | 1     |
| Primer Mix D (blauer Deckel)  | 2 mL Schraubgefäß                    | 1     |
| PCR Buffer (inkl. Polymerase) | 1,5 mL Schraubgefäß                  | 1     |
| Hybridisation Buffer          | 30 mL Plastikgefäß                   | 1     |
| Washing Buffer                | 60 mL Plastikgefäß                   | 1     |
| Enzyme (lila Deckel)          | 2 mL Schraubgefäß mit 500 µL Einsatz | 1     |
| Blocking Powder               | 15 mL Plastikgefäß                   | 1     |
| Blocking Buffer               | 60 mL Plastikgefäß                   | 1     |
| SSPE                          | 15 mL Plastikgefäß                   | 1     |
| Substrate                     | 30 mL Plastikgefäß (braun)           | 1     |
| DNA Ref *1/M166V              | 2 mL Schraubgefäß                    | 1     |
| MutaCHiPs                     | 1,5 mL Gefäß                         | 20    |
| Gebrauchsanweisung            | /                                    | 1     |

## 5 Erforderliche Materialien

*Benötigte Geräte - von PharmGenomics erhältlich:*

- Macroarray Analysing Tool (MAAT):
  - Notebook + DPYD Genotyping Software
  - MutaCHIP Imagereader
  - Thermocycler für PCR (Peglab Primus 25 advanced)
  - Thermomixer mit Kühlfunktion (BIOR Mixing Block MB-102)

*Benötigte Geräte und Verbrauchsmaterialien - nicht mitgeliefert:*

- Pipetten:
  - 0.1 - 2.5 µL
  - 0.5 - 10 µL
  - 10 - 200 µL
  - 100 - 500 µL
- 0,2 ml PCR Gefäße (steril)

## 6 Lagerung und Haltbarkeit

- Alle Komponenten sind bei 2-8 °C zu lagern.
- Das Substrat ist unbedingt vor Lichteinwirkung zu schützen.
- Im Inneren des Beutels befinden sich 5x MutaCHIPs mit jeweils geöffnetem Deckel. Wenn ein Lichtschutzfolien-Beutel geöffnet wurde, müssen die Deckel der darin verbleibenden MutaCHIPs unbedingt geöffnet bleiben, da das Schutzgas entweicht.
- Die MutaCHIPs können im wieder lose (nicht luftdicht) verschlossenen (keine Klebestreifen verwenden!) Lichtschutzfolien-Beutel mehrere Wochen bei Raumtemperatur (RT) gelagert werden. Dabei einen dunklen und trockenen (vor Feuchtigkeit schützen) Ort zur Aufbewahrung auswählen.
- Um selbst minimale Performanceverluste zu vermeiden, empfehlen wir jedoch den Verbrauch eines geöffneten MutaCHIP Beutels möglichst innerhalb von zwei Wochen!
- Die MutaCHIPs sind gegen direkte Sonneneinstrahlung und Staub zu schützen.

## 7 Arbeitsbedingungen

- Die MutaCHIPs dürfen niemals zentrifugiert werden.
- Die Oberfläche des MutaCHIPs darf nicht mit der Pipettenspitze berührt werden
- Der MutaCHIP darf nur mit den im Protokoll erwähnten Substanzen verwendet werden.

## 8 Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Die Vorschriften und Grundsätze für molekularbiologisches Arbeiten müssen eingehalten werden.

- Der Test ist zur Verwendung mit **frisch** extrahierter genomischer DNA aus EDTA-Vollblut als Ausgangsmaterial geeignet. Nur dann können optimale Ergebnisse sichergestellt werden.
- Mischen Sie keine Reagenzien aus unterschiedlichen Lots.
- Die MutaCHIPs sind:
  - nur für den Einmalgebrauch bestimmt
  - nur zur *in-vitro* Diagnostik zu verwenden
- Der MutaCHIP darf während den Arbeitsschritten nicht austrocknen!
- Der MutaCHIP ist für den Gebrauch mit dem MAAT und der dazugehörigen Software von PharmGenomics ausgelegt.
- Die Arbeitsschritte zügig durchführen.
- Alle Ausgangslösungen während des Arbeitens kühlen.
- Das MutaCHIP-Gefäß mit zwei Händen öffnen. Dabei ist darauf zu achten, dass kein Druck auf den MutaCHIP ausgeübt wird.

## 9 Probengewinnung

Als Matrize für die PCR Amplifikation dient genomische DNA aus EDTA-Vollblut. Die DNA-Konzentration sollte zwischen 15-30ng/µl liegen. Die Reinheit ( $OD_{260/280}$ ) der DNA sollte höher als 1.8 sein.

**Für den Assay darf nur hochmolekulare (frisch extrahierte) DNA verwendet werden.**

## 10 Testdurchführung

### 10.1 PCR Produktherstellung

Die unten stehenden Tabellen zeigen die Zusammensetzung für eine Analyse des DPYD - Gens pro 25 µL Reaktionsansatz.

Master Mix 1:

| Bestandteil                           | Volumen pro 25 µL- Reaktionsansatz |
|---------------------------------------|------------------------------------|
| DNA (ca. 60-120 ng)                   | 4 µL                               |
| Primer Mix A ( <b>grüner Deckel</b> ) | 8 µL                               |
| PCR H <sub>2</sub> O                  | 0,5 µL                             |
| PCR Buffer (inkl. Polymerase)         | 12,5 µL                            |

Master Mix 2:

| Bestandteil                           | Volumen pro 25 µL- Reaktionsansatz |
|---------------------------------------|------------------------------------|
| DNA (ca. 60-120 ng)                   | 4 µL                               |
| Primer Mix B ( <b>gelber Deckel</b> ) | 6 µL                               |
| PCR H <sub>2</sub> O                  | 2,5 µL                             |
| PCR Buffer (inkl. Polymerase)         | 12,5 µL                            |

Master Mix 3:

| Bestandteil                          | Volumen pro 25 µL- Reaktionsansatz |
|--------------------------------------|------------------------------------|
| DNA (ca. 60 ng)                      | 2 µL                               |
| Primer Mix C ( <b>roter Deckel</b> ) | 2 µL                               |
| PCR H <sub>2</sub> O                 | 8,5 µL                             |
| PCR Buffer (inkl. Polymerase)        | 12,5 µL                            |

Master Mix 4:

| Bestandteil                           | Volumen pro 25 µL- Reaktionsansatz |
|---------------------------------------|------------------------------------|
| DNA (ca. 60 ng)                       | 2 µL                               |
| Primer Mix D ( <b>blauer Deckel</b> ) | 2 µL                               |
| PCR H <sub>2</sub> O                  | 8,5 µL                             |
| PCR Buffer (inkl. Polymerase)         | 12,5 µL                            |

Die Proben in den Thermocycler stellen und das in 10.2 beschriebene PCR Protokoll verwenden.

## 10.2 PCR Protokoll

Das PCR-Protokoll muss für jedes Labor erneut etabliert werden, da die verschiedenen Thermocycler unterschiedliche Heizraten haben. Diese Etablierung entfällt, wenn der empfohlene Thermocycler verwendet wird (PeqLab Primus 25 advanced). Für die Etablierung kann mit dem folgenden Standard-Protokoll begonnen werden:

|                  | Temperatur in °C | Zeit in Sekunden | Zyklen |
|------------------|------------------|------------------|--------|
| Start            | 95               | 300              | 1 x    |
| Denaturation     | 95               | 30               | 40 x   |
| Annealing        | 51,3             | 30               |        |
| Elongation       | 72               | 50               |        |
| Final Elongation | 72               | 420              | 1 x    |
| Pause            | 4                | 8                |        |



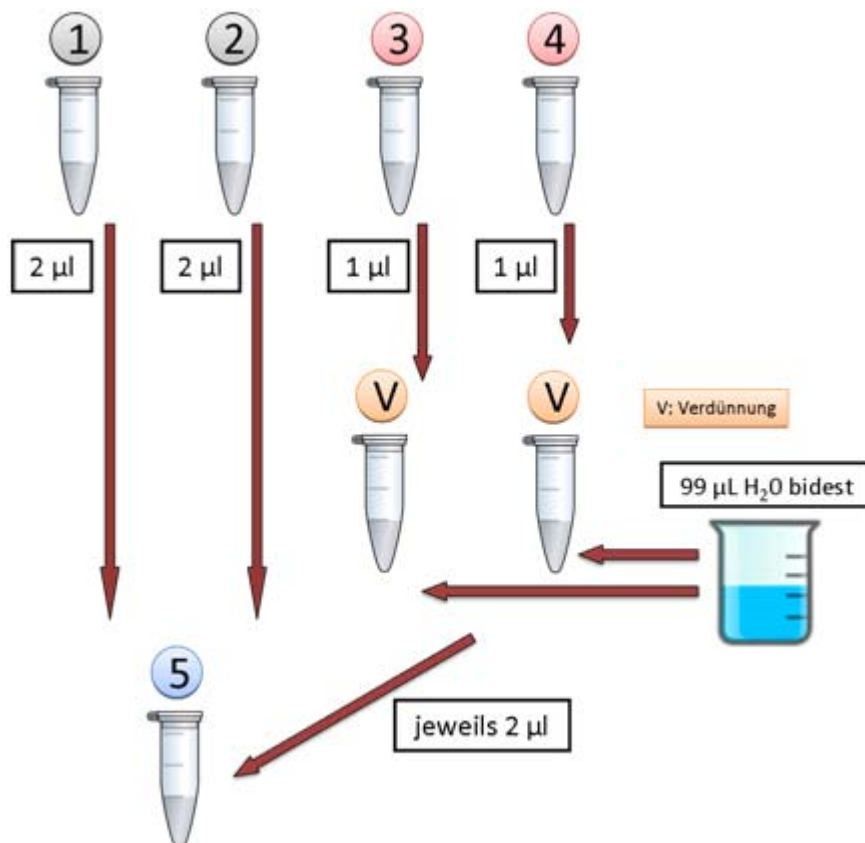
## 10.3 MutaChip Protokoll

### A) Vorbereitung des Hybridisierungspuffers

Falls der Hybridisation Buffer trüb oder flockig geworden ist, kann dieser für wenige Sekunden in der Mikrowelle (240 W) oder in einem Wasserbad erwärmt und durch Schwenken homogenisiert werden, bis er wieder klar ist. Vor dem Verwenden muss der Puffer auf Raumtemperatur (RT) abgekühlt werden.

### B) Vorbereitung der DNA Proben

- Den Thermoshaker auf **48°C** vorheizen
- Jeweils **2 µL** der amplifizierten Proben von Master Mix 1 und 2 unverdünnt in ein PCR-Reaktionsgefäß (5) überführen
- Anschließend die Amplifikate von Master Mix 3 und 4 **1:100** verdünnen. Hierzu jeweils **1 µL** der Amplifikate von MM3 und MM4 in jeweils ein PCR-Reaktionsgefäß überführen und mit **99 µL** Nuklease freiem Wasser mischen
- Von diesen Verdünnungen jeweils **2 µL** in das PCR- Reaktionsgefäß (5) überführen



- Die vorbereitete Probe für **2 min.** bei **95°C** im Thermocycler denaturieren
- Anschließend wird die denaturierte Probe mit Hybridisation Buffer auf 100 µL aufgefüllt (**8 µL** DNA+ **92 µL** Hybridisation Buffer)
- Das Gemisch vollständig in den MutaCHIP pipettieren ohne dabei den Boden zu berühren

### C) Hybridisierung

- Hybridisieren der Probe bei **48°C, 550rpm** für **60 min**
- Während der Hybridisierungszeit muss der Blocking Mix angesetzt werden
- Hierzu **0.02 g** Blocking Powder in **1 mL** Blocking Buffer bei **65°C** lösen und danach vortexen (Dauer des Vorgangs: etwa 10 - 15 min.) Anschließend auf Raumtemperatur abkühlen lassen

## D) Waschschritte nach der Hybridisierung

Den Thermoshaker auf **41°C** temperieren.

**Achtung: Während des Herunterkühlens des Thermoshakers muss der MutaCHIP unbedingt aus dem Shaker entnommen werden! Der Hybridisation Buffer muss auf dem MutaCHIP verbleiben bis die Zieltemperatur erreicht ist!**

Achtung: Auf korrekte Einstellung des Volumens achten!

- Den Hybridisation Buffer aus Schritt C) vollständig entfernen
- **500 µL** Washing Buffer vorsichtig auf den MutaCHIP pipettieren
- Waschen des MutaCHIPS bei **41°C, 550 rpm** für **5 min**
- Nach Ablauf des ersten Waschschritts den Washing Buffer vollständig entfernen
- Erneut **500 µL** Washing Buffer vorsichtig auf den MutaCHIP pipettieren
- Erneutes waschen des MutaCHIPS bei **41°C, 550 rpm** für **5 min**

## E) Blockingschritt

Den Thermoshaker auf **21°C** temperieren.

**Achtung: Während des Runterkühlens des Thermoshakers muss der MutaCHIP unbedingt aus dem Shaker entnommen werden! Der Washing Buffer muss auf dem MutaCHIP verbleiben bis die Zieltemperatur erreicht ist!**

Achtung: Auf korrekte Einstellung des Volumens achten!

- Den Washing Buffer aus Schritt D) vollständig entfernen
- **100 µL** Blocking Mix vorsichtig auf den MutaCHIP pipettieren
- Blocken des MutaCHIPS bei **21°C, 550 rpm** für **15 min**
- Während des Blockens muss der Enzyme Mix angesetzt werden. Hierzu **75 µL** SSPE mit **175 µL** PCR-H<sub>2</sub>O und **0,5 µL** Enzyme (**lila Deckel**) mischen und bis zum Gebrauch bei 4 °C lagern. Dieser Ansatz reicht für 2 MutaCHIPS

## F) Enzymkonjugation

Achtung: Auf korrekte Einstellung des Volumens achten!

- Den Blocking Mix aus Schritt E) vollständig entfernen
- **100 µL** Enzyme Mix vorsichtig auf den MutaCHIP pipettieren
- Konjugieren des MutaCHIPS bei **21°C, 550 rpm** für **15 min**.

## G) Zweiter Waschschritt

Achtung: Auf korrekte Einstellung des Volumens achten!

- Den Enzyme Mix aus Schritt F) vollständig entfernen
- **500 µL** Washing Buffer vorsichtig auf den MutaCHIP pipettieren
- Waschen des MutaCHIPS bei **21°C, 550 rpm** für **5 min**

## H) Färbung

Achtung: Auf korrekte Einstellung des Volumens achten! **Der Chip darf während und nach dem Färben nicht geschüttelt werden!**

- Den Washing Buffer aus Schritt F) vollständig entfernen
- **100 µL** Substrate in den MutaCHIP geben und für **5 min** bei **21°C** inkubieren. Dazu den MutaCHIP in den Thermoshaker überführen (**keine Schüttelfunktion aktivieren**)
- Danach das Substrate wieder vollständig entfernen (Pipette) und umgehend **500 µL** Washing Buffer hinzugeben
- MutaCHIP in den Imagereader überführen (auf korrekte Platzierung achten), Bild erstellen und mit der Analyse/ Auswertung beginnen (siehe folgendes Kapitel)

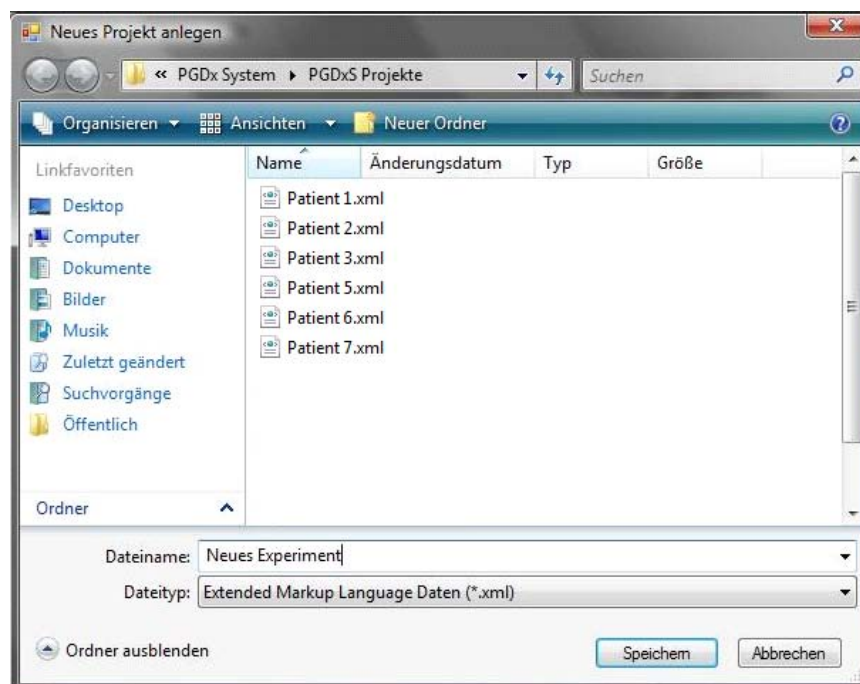
## 11 Auswertung

Die Auswertung erfolgt über das MAAT und die DPYD Genotyping Software. Die Ergebnisse werden mit Hilfe der Software in einem Report zusammengestellt. Für die Auswertung des Chips folgen Sie der folgenden kurzen Anleitung. Für weitere und detailliertere Informationen sehen Sie bitte im DPYD Genotyping Software Handbuch nach.

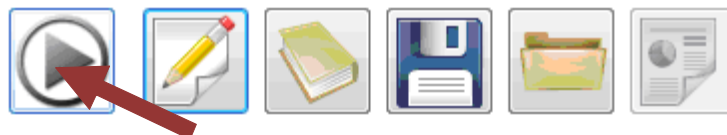
### Schritt 1: Ein neues Projekt erstellen



Klicken Sie auf die Schaltfläche *Neues Experiment*. Vergeben Sie einen beliebigen Namen für das Experiment und speichern Sie es anschließend, indem Sie auf die Schaltfläche *Speichern* klicken.

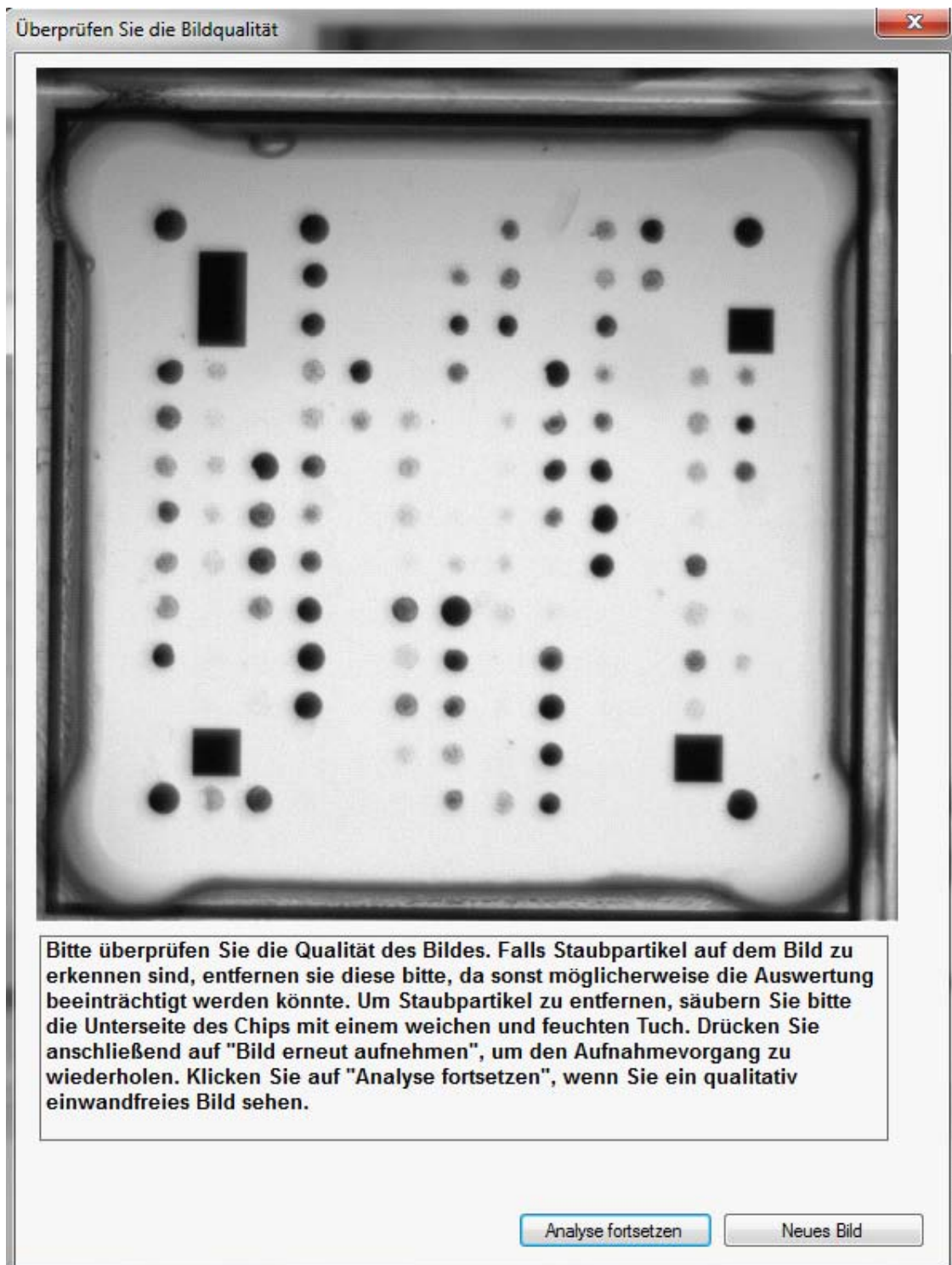


### Schritt 2: Analyseprozess starten



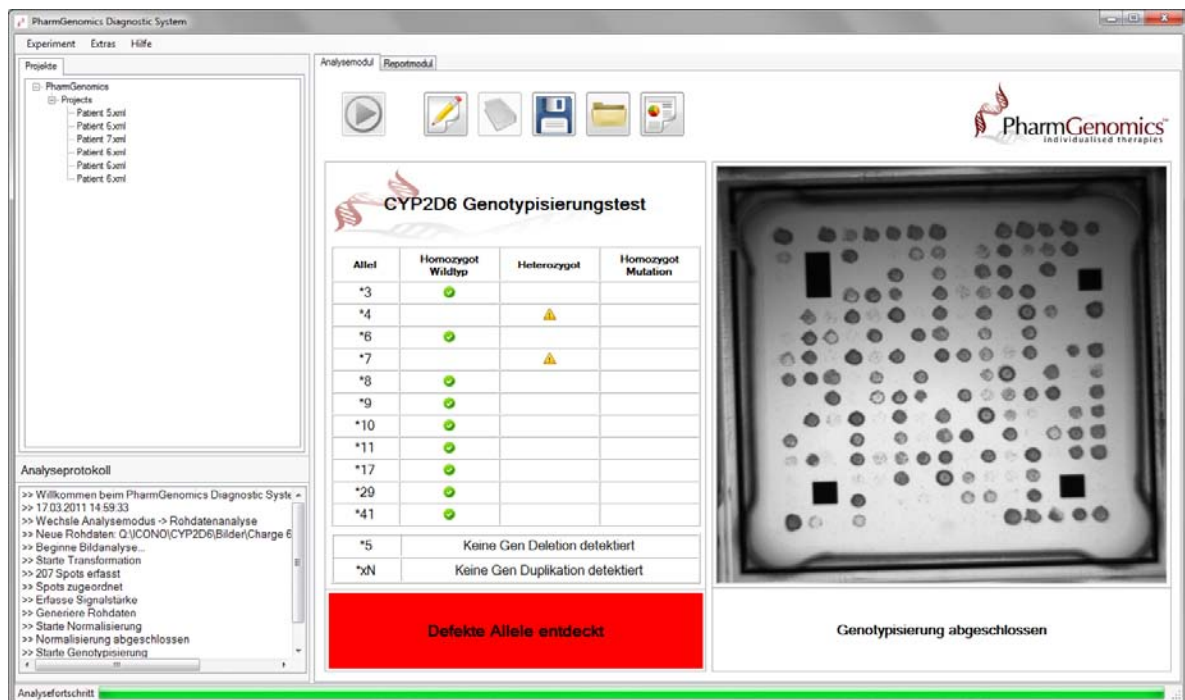
Klicken Sie auf die Schaltfläche *Start*, um die Datenanalyse zu starten.

### Schritt 3: Qualitätsprüfung des MutaCHIPs



Um ein einwandfreies Analyseergebnis zu erhalten, muss zunächst die Bildqualität des MutaCHIPs überprüft werden. Staubpartikel auf der Unterseite des MutaCHIPs können die Analyse beeinträchtigen. Diese können durch das säubern mit einem weichen und feuchten Tuch entfernt werden. Klicken Sie auf die Schaltfläche Analyse fortsetzen, falls die Bildqualität der in der oberen Abbildung entspricht.

## Schritt 4: Genotypisierungsergebnisse



Nach der vollständigen Datenanalyse können Sie die Ergebnisse im Analysemodul / Genotypisierungsmodul oder im Diagnosebericht abrufen. Die dabei verwendete Symbole werden in der unten stehenden Tabelle erläutert.

### Symbole der Software und ihre Bedeutung

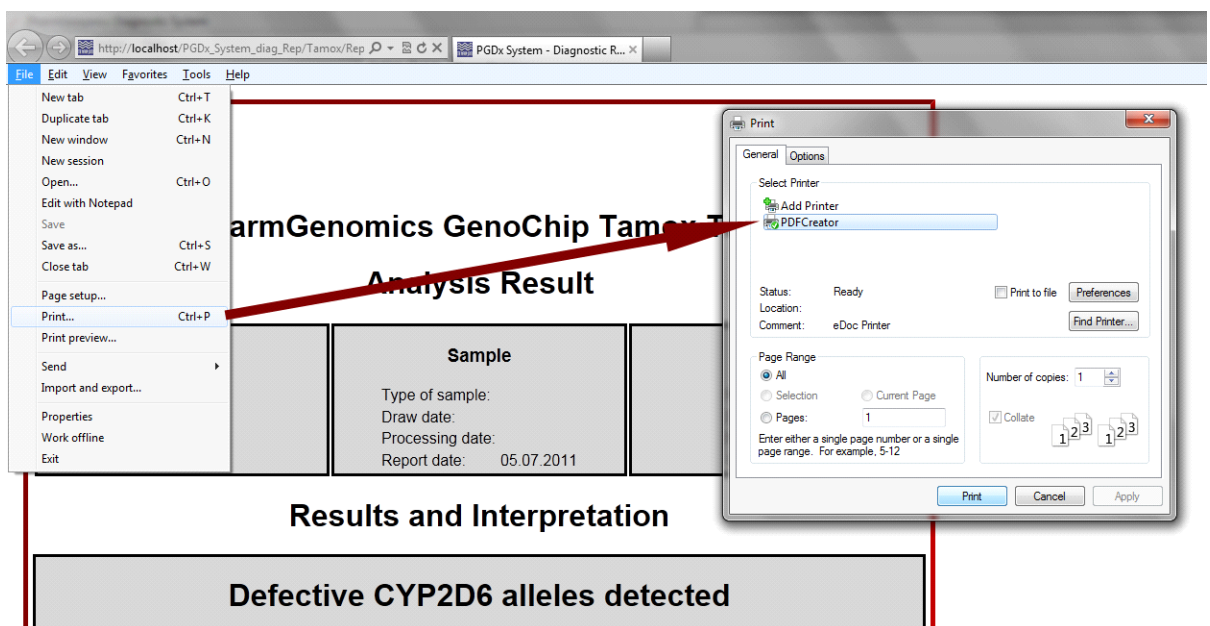
|  |  |
|--|--|
|  | Der Patient trägt auf beiden Allelen die gesunde Variante der untersuchten genetischen Variation.  |
|  | Der Patient trägt auf einem Allel die gesunde und auf dem anderen Allel die mutierte genetische Variation.   |
|  | Der Patient trägt auf beiden Allelen die mutierte genetische Variation in homozygoter Form.  |
|  | Die Signalwerte der Sonden für diese genetische Variation sind zu gering, um ein valides Ergebnis zu erzeugen. Dies könnte auf Sequenzveränderungen in direkter Nähe zur untersuchten Variation hindeuten. Die anderen Signale werden jedoch durch den Ausfall nicht beeinträchtigt. |
|  | Beide Sonden für diese genetische Variation erzeugen ein nicht gültiges Signal. Dies könnte auf eine Verschmutzung auf der Chipoberfläche zurückzuführen sein. Die anderen Signale werden jedoch durch den Ausfall nicht beeinträchtigt.   |

## Schritt 5: Diagnostischer Report



Um die Daten auszuwerten, lassen Sie sich den diagnostischen Report anzeigen. Klicken Sie hierfür auf die Schaltfläche *Report*.

Zusätzlich können Sie auch ein .pdf Dokument erstellen oder den Report direkt ausdrucken.



## 12 Troubleshooting

| Problem   | Lösung   |
|---|--|
| <b>Software Meldung:</b> Warnung! Die Signale des Biotinreferenzmarkers sind zu niedrig. Dies kann ein Zeichen für einen fehlgeschlagenen oder nicht ausgeführten Konjugationsschritt sein oder das Enzym ist nicht mehr funktional. Das System muss gestoppt werden. | Prüfen Sie das Enzym und/oder Substrat. Wiederholen Sie den Assay mit neuem Enzym/Substrat.  |
| <b>Software Meldung:</b> keine Fehlerangabe<br>ErrorCode - 3011   | Der Reader ist nicht richtig angeschlossen. Halten Sie „Esc“ für 3 Sekunden gedrückt und schließen Sie den Reader in der richtigen Art und Weise an - bitte wenden Sie sich an das Benutzerhandbuch des PGDx-Systems.            |
| Schlechte Bildqualität  | Reinigen Sie die Bodenunterseite des Arraygefäßes. Benutzen Sie ein weiches Tuch, das mit Desinfektionsmittel angefeuchtet ist.<br><br>Wiederholen Sie das Foto (es kann notwendig sein diesen Schritt mehrfach zu wiederholen). |
| Unscharfes Bild   | Reinigen Sie vorsichtig die Kamera mit einem Tuch oder einem Wattstäbchen.   |





# MutaCHIP<sup>®</sup> 5-FU

DNA-Macroarray Kit for the analysis of mutations in the  
Dihydropyrimidine-Dehydrogenase Gene



For in vitro diagnostics only



KF391006



10



KF390006



20



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany  
[www.immundiagnostik.com](http://www.immundiagnostik.com)  
[info@immundiagnostik.com](mailto:info@immundiagnostik.com)  
 Tel.: +49 (0)6251/ 701900  
 Fax: +49 (0)6251/ 849430



# Content

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1 Application</b>                               | <b>3</b>  |
| <b>2 Introduction</b>                              | <b>3</b>  |
| <b>3 Concept of the Assay</b>                      | <b>4</b>  |
| <b>4 Components</b>                                | <b>4</b>  |
| <b>5 Materials</b>                                 | <b>5</b>  |
| <b>6 Storage and Shelf life</b>                    | <b>5</b>  |
| <b>7 Working Conditions</b>                        | <b>5</b>  |
| <b>8 Considerations and Precautions</b>            | <b>6</b>  |
| <b>9 Sample Collection</b>                         | <b>6</b>  |
| <b>10 Test Procedure</b>                           | <b>7</b>  |
| 1 PCR Product Generation.....                      | 7         |
| 2 PCR Protocol.....                                | 8         |
| 3 MutaCHIP Protocol.....                           | 9         |
| <b>11 Evaluation and Interpretation of Results</b> | <b>11</b> |
| <b>12 Trouble shooting</b>                         | <b>15</b> |

# 1 Application

The MutaCHIP® 5-FU Kit is a bio-molecular test for the examination of mutations of the Dihydropyrimidine-Dehydrogenase gene (DPYD) from a genomic DNA sample. This test is based on a MutaCHIP technology. The investigated variations are connected to a decrease in (or absence of) DPD enzyme activity, which in turn leads to an increased risk for severe side effects and toxicities during 5-Fluorouracil (5-FU) chemotherapy. The following variations are covered by the test:

- DPYD\*2A
- DPYD\*3
- DPYD\*4
- DPYD\*7
- DPYD\*8
- DPYD\*10
- DPYD\*12
- DPYD\*13
- DPYD M166V
- DPYD A551T
- DPYD D949V

# 2 Introduction

Next to age, gender and environmental influences such as diet and co medication, there are genetic factors that have a major impact on the catalytic activity of many enzymes. It is known that patients with decreased or totally absent function of the Dihydropyrimidine-Dehydrogenase (DPD) enzyme, are at a higher risk to develop severe to lethal side effects during chemotherapy with 5-Fluorouracil. Those effects range between grades 3-4 according to the WHO. 5-FU is a cytostatic drug that is routinely used for the treatment of many solid tumours. Analysis of the DPYD gene can help to reduce the risk of 5-FU related toxicities by anticipating the catalytic function of the DPD enzyme for each individual patient. With this assay patients bearing variants leading to a decreased enzyme activity can be identified prior to therapy initiation, and can be treated accordingly with lower doses or alternative medications if applicable. Forty percent (40%) of all patients bearing one of the variants and treated with 5-FU will experience severe side effects. As many cases of 5-FU related side effects can be explained by mutations in the DPYD gene, genotyping of those variants can help to optimize and individualize chemotherapies to prevent undesired effects and lower the costs that emerge from prolonged hospitalization and the treatment of adverse reactions.

## References:

- Mol Cancer Ther. 2006; 5(11):2895-2904
- Clin Cancer Res. 2004; 10(17):5880-5888
- Clin Cancer Res. 2006; 12(13):3928-3934
- Pharmacogenomics. 2001; J1:65-70
- J Clin Oncol. 2008; 26(13):2130-2137

### 3 Concept of the Assay

To analyse the mutations a PCR is performed, which amplifies the variable parts of the DPYD gene using freshly extracted genomic DNA as template. The amplification product is transferred to the MutaCHIP and is treated following the provided protocol. The analysis allows distinct genotyping of all variants of the DPYD gene that are spotted onto the MutaCHIP.

The amplified product binds onto the MutaCHIP to the immobilised probes. In a washing step the unspecific fragments are removed from the surface. Subsequently, the Enzyme Mix is added to the MutaCHIP, coupling with the probe-target complex. After addition of the substrate, a precipitate will form. This precipitate is then detected by the Image reader and the signals are evaluated by the software.

### 4 Components

Each test kit contains the following components for 20 MutaCHIP 5-FU assays and the instruction manual:

| Description                      | Size of Reaction Tube or Flask | Number |
|----------------------------------|--------------------------------|--------|
| 5-FU - Primer Mix A (green lid)  | 2 mL Reaction Tube             | 1      |
| 5-FU - Primer Mix B (yellow lid) | 2 mL Reaction Tube             | 1      |
| 5-FU - Primer Mix C (red lid)    | 2 mL Reaction Tube             | 1      |
| 5-FU - Primer Mix D (blue lid)   | 2 mL Reaction Tube             | 1      |
| PCR Buffer (incl. Polymerase)    | 2 mL Reaction Tube             | 1      |
| Hybridisation Buffer             | 30 mL Reaction Tube            | 1      |
| Washing Buffer                   | 60 mL Plastic Flask            | 1      |
| Blocking Powder                  | 15 mL Plastic Flask            | 1      |
| Blocking Buffer                  | 60 mL Plastic Flask            | 1      |
| Enzyme (purple lid)              | 2 mL Reaction Tube             |        |
| SSPE                             | 15 mL Plastic Flask            | 1      |
| Substrate                        | 30 mL Plastic Flask            | 1      |
| DNA Ref *1 / M166V               | 2 mL Reaction Tube             | 1      |
| MutaCHIPs                        | 1,5 mL Reaction Tube           | 20     |
| Instruction manual               | /                              | 1      |

## 5 Materials

*Required materials that can be ordered separately from PharmGenomics:*

- Macroarray Analysing Tools (MAAT):
  - Notebook + DPYD Genotyping Software
  - MutaCHIP image reader
  - Thermocycler (PqLab Primus 25 advanced)
  - Thermoshaker with cooling function (BIOR Mixing Block MB-102)

*Required Materials – not provided*

- pipettes:
  - 0.1 - 2.5 µL
  - 05 - 10 µL
  - 10 - 200 µL
  - 100 - 500 µL
- 0.2 mL PCR tubes (sterile)

## 6 Storage and Shelf life

- All components are stored at 2-8 °C.
- The substrate has to be strictly protected against light exposure.
- The bags contain each 5x MutaCHIPs with open lids. After unsealing a bag, the lids of the remaining MutaCHIPs have to remain open as the protection gas escapes.
- The MutaCHIPs can be stored in the loosely (not airtight) closed (do not use tape) light-protection bag up to several weeks and room temperature (RT). For storage choose a dry and dark place.
- To avoid even minimal loss of performance, we recommend using up one bag of MutaCHIPs within two weeks.
- The MutaCHIPs have to be protected against direct exposure to sunlight and dust.

## 7 Working Conditions

- Never centrifuge the MutaCHIPs.
- Do not touch the surface of the MutaCHIPs with a pipette.
- Use only substances that are mentioned in the protocol.

## 8 Considerations and Precautions

The guidelines and principles for working in a biomolecular laboratory have to be followed.

- The test is suitable for genomic DNA **freshly** extracted from whole EDTA blood as starting material. Only then optimal results are guaranteed.
- Do not mix reagents from different lots.
- The MutaCHIPs are:
  - for single-use only
  - only for *in vitro* diagnostics
- Do not let the MutaCHIP dry out while performing the analysis!
- The MutaCHIP is designed for the use with the MAAT and the software provided by PharmGenomics.
- Perform all steps in a timely manner.
- Keep all stock solutions cooled while working.
- Always open the MutaCHIP with both hands. Do not apply pressure to the tube.

## 9 Sample Collection

The template for PCR amplification is genomic DNA from EDTA whole blood. The DNA concentration should be between 15 and 30 ng/μL. The minimum DNA purity (A260/A280 ratio) should be higher than OD 260/280 1.8.

**For the assay high molecular (freshly extracted) DNA has to be used.**

## 10 Test Procedure

### 10.1 PCR Product Generation

The table below shows the composition and pipetting scheme for one analysis of the DPYD gene per 25 µL reaction. To amplify all targets, 4 reaction tubes are needed per assay, one for each Master Mix. All components should be pipetted in the same order as they are listed in the tables.

Master Mix 1:

| Component                     | Volume per 25 µL reaction |
|-------------------------------|---------------------------|
| DNA (min. 60 - max. 120 ng)   | 4 µL                      |
| Primer Mix A (green lid)      | 8 µL                      |
| PCR H <sub>2</sub> O          | 0.5 µL                    |
| PCR Buffer (incl. Polymerase) | 12.5 µL                   |

Master Mix 2:

| Component                     | Volume per 25 µL reaction |
|-------------------------------|---------------------------|
| DNA (min. 60 - max. 120 ng)   | 4 µL                      |
| Primer Mix B (yellow lid)     | 6 µL                      |
| PCR H <sub>2</sub> O          | 2.5 µL                    |
| PCR Buffer (incl. Polymerase) | 12.5 µL                   |

Master Mix 3:

| Component                     | Volume per 25 µL reaction |
|-------------------------------|---------------------------|
| DNA (min. 30 - max. 60 ng)    | 2 µL                      |
| Primer Mix C (red lid)        | 2 µL                      |
| PCR H <sub>2</sub> O          | 8.5 µL                    |
| PCR Buffer (incl. Polymerase) | 12.5 µL                   |

Master Mix 4:

| Component                     | Volume per 25 µL reaction |
|-------------------------------|---------------------------|
| DNA (min. 30 - max. 60 ng)    | 2 µL                      |
| Primer Mix D (blue lid)       | 2 µL                      |
| PCR H <sub>2</sub> O          | 8.5 µL                    |
| PCR Buffer (incl. Polymerase) | 12.5 µL                   |

The samples are placed in the thermocycler and the program described in 10.2 is to be applied.

## 10.2 PCR Protocol

The PCR protocol has to be established anew for each laboratory, as different thermocyclers have different heating rates. This establishment can be omitted when using the recommended thermocycler (Peqlab Primus 25 advanced). The following standard protocol can be used to start the establishing process:

|                   | Temperature [°C] | Time [sec] | Cycles |
|-------------------|------------------|------------|--------|
| Start             | 95               | 300        | 1 x    |
| Denaturation      | 95               | 30         | 40 x   |
| Annealing         | 51.3             | 30         |        |
| Elongation        | 72               | 50         |        |
| Finale Elongation | 72               | 420        | 1 x    |
| Pause             | 4                | 8          |        |

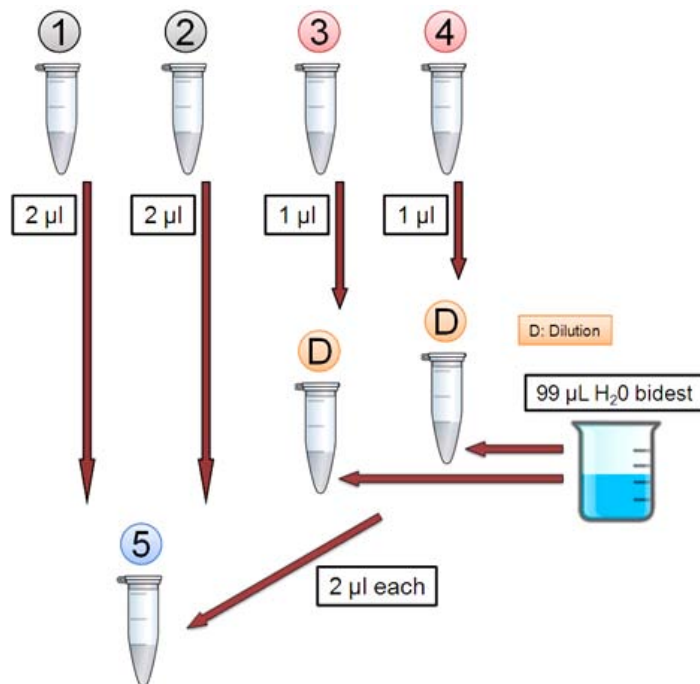
### 10.3 MutaCHIP Protocol

#### A) Preparation of the Hybridisation Buffer

If the Hybridisation Buffer is turbid or a precipitate can be seen, it has to be heated in a microwave for several seconds (240 W) or in a water bath. Gently shake the Hybridisation Buffer until it gets clear, to homogenise it again. Before usage, it has to be cooled to room temperature (RT).

#### B) Preparation of DNA samples

- Head up the thermoshaker to **48°C**
- Transfer **2 µL** of the amplified samples from Master Mix 1 and 2 into a fresh PCR reaction tube (5).
- Dilute the PCR products from Master Mix 3 and 4 each **1:100**. For this use **1 µL** of each sample and mix it with **99 µL** PCR water (nuclease free) in a fresh PCR reaction tube.
- Then Transfer **2 µL** of each of these dilutions into the reaction tube (5).



- Denature the prepared samples for **2 min** at **95°C** in a thermocycler
- Subsequently fill up the denatured DNA sample to 100 µL with Hybridisation Buffer (**8 µL** PCR product + **92 µL** Hybridisation Buffer)
- Pipette the whole mixture into the MutaCHIP without touching the reaction surface

#### C) Hybridisation

- Perform the hybridisation at **48°C**, **550rpm** for **60 min**.
- During this hybridisation time the Blocking Mix has to be prepared. To do so, add **0.02 g** Blocking Powder to **1 mL** Blocking Buffer, mix by vortexing and solubilise this at **65°C**. Then allow the Blocking Mix to cool down to **RT** before use!



#### D) Washing steps after Hybridisation

Set the thermoshaker to **41°C**.

**Note: During the cooling period the MutaCHIP has to be removed from the thermoshaker! The Hybridisation Buffer has to remain on the MutaCHIP until the target temperature is reached!**

Caution: Pay attention to the correct adjustment of volume!

- Completely remove the Hybridisation Buffer from step C)
- Add carefully **500 µL** of Washing Buffer onto the MutaCHIP
- Wash the MutaCHIP at **550 rpm** and **41°C** for **5 min**
- Completely remove the Washing Buffer
- Add carefully **500 µL** of Washing Buffer onto the MutaCHIP
- Wash **again** the MutaCHIP at **550 rpm** and **41°C** for **5 min**

#### E) Blocking Step

Set the thermoshaker to **21 °C**.

**Note: During the cooling period the MutaCHIP has to be removed from the thermoshaker! The Washing Buffer has to remain on the MutaCHIP until the target temperature is reached!**

Caution: Pay attention to the correct adjustment of volume!

- Completely remove the Washing Buffer from step D)
- Add **100 µL** of Blocking Mix to the MutaCHIP
- Incubate the MutaCHIP at **550 rpm** and **21°C** for **15 min**
- During the blocking the Enzyme Mix has to be prepared. Add **75 µL** SSPE to **175 µL** PCR H<sub>2</sub>O and **0.5 µL** Enzyme (**purple lid**), mix and store at 4 °C until use. This amount can be used for 2 MutaCHIPS

#### F) Enzyme Conjugation

Caution: Pay attention to the correct adjustment of volume!

- Completely remove the Blocking Mix from step E)
- Add **100 µL** of Enzyme Mix to the MutaCHIP
- Incubate the MutaCHIP at **550 rpm** and **21°C** for **15 min**

#### G) Washing step after Enzyme conjugation

Caution: Pay attention to the correct adjustment of volume!

- Completely remove the Enzyme Mix from step F)
- Add of **500 µL** Washing Buffer to the MutaCHIP
- Wash the MutaCHIP at **550 rpm** and **21°C** for **5 min**

#### H) Precipitation

Caution: Pay attention to the correct adjustment of volume! **Do not shake the MutaCHIP during the precipitation!**

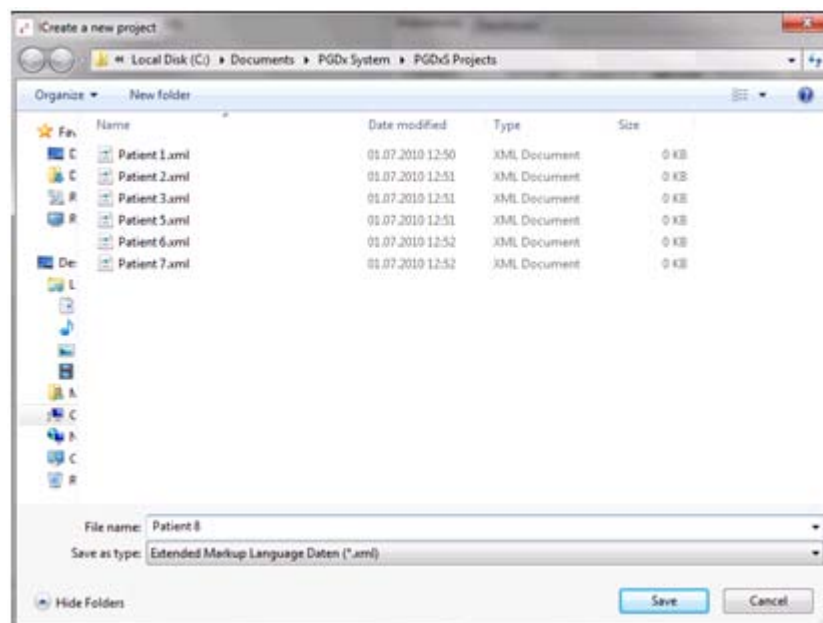
- Completely remove the Washing Buffer from step G)
- Add **100 µL** of Substrate to the MutaCHIP and incubate for **5 min** at **21°C**. To do so, put the MutaCHIP into the thermoshaker (**Do not activate shaking function**)
- Thereafter, remove the Substrate completely (pipette) and immediately add **500 µL** of Washing Buffer
- Place the MutaCHIP into the image reader (pay attention to the correct orientation), take a picture and start with the analysis/evaluation of the results (see following chapter)

## 11 Evaluation and Interpretation of Results

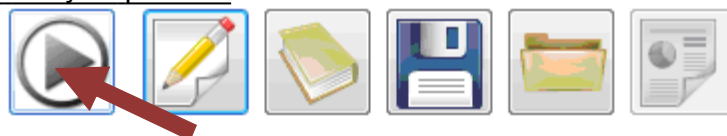
The evaluation is performed using the MAAT and the DPYD Genotyping Software. The results are compiled with help of the software into a report. For the evaluation of the chip, follow the short instructions below. For further and detailed information, please refer to the NutriGenomics Software handbook.

### Step 1: Create a new project

Click on the button *New experiment*. Assign an arbitrary name for the experiment and subsequently save it by clicking on the button *save*.

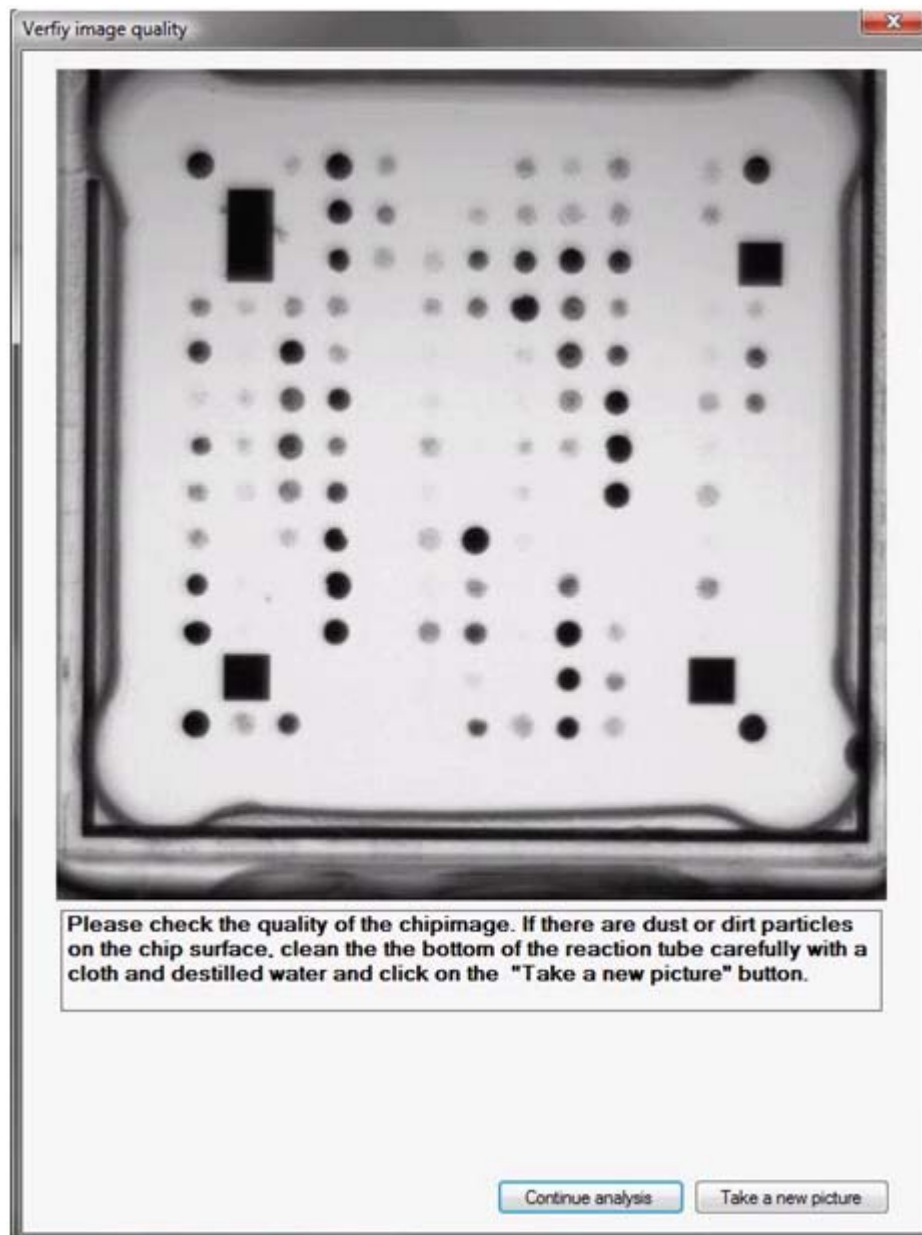


### Step 2: Start the analysis process



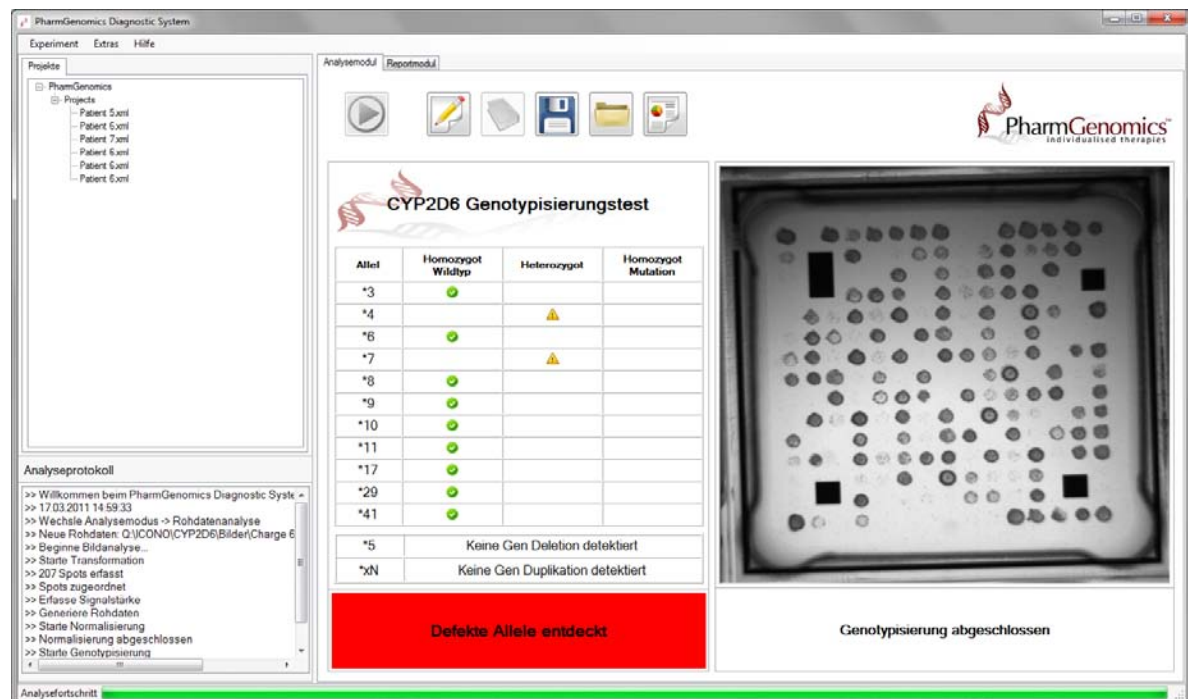
Click on the *Start* button to initiate data analysis.

### Step 3: Quality check of the chip



To ensure a correct analysis result, the picture quality of the MutaCHIP has to be checked. Particles of dust on the bottom side of the MutaCHIP can affect the analysis. These can be removed by cleaning with a soft and wet tissue. Follow the instructions given in the screen shown here. Press *Continue analysis* if the quality of the picture is comparable to the figure above.

### Step 4: Genotyping results



After the complete data analysis, the results can be access in the analysis module / genotyping module or in the diagnostic report. The used icons are explained in the following table.

### Symbole der Software und ihre Bedeutung

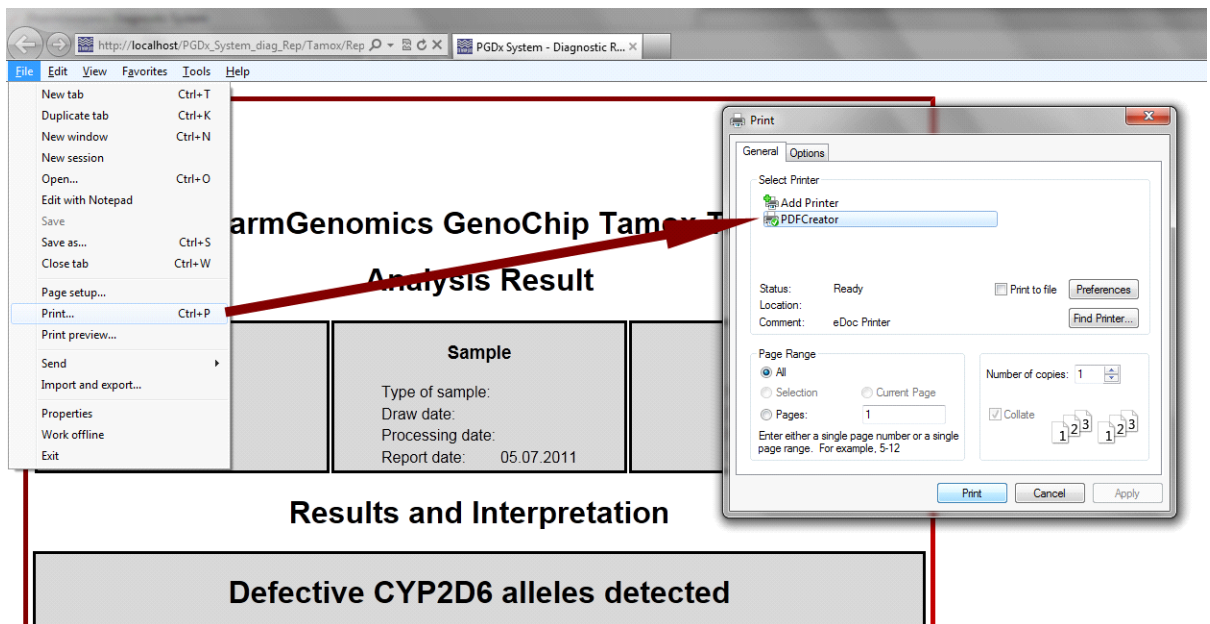
|  |  |
|--|--|
|  | The patient carries on both alleles the healthy variant of the investigated genetic variants.  |
|  | The patient carries on one allele the healthy and on the other allele the mutated genetic variant.   |
|  | The patient carries on both alleles the mutated genetic variation in homozygous form.  |
|  | The signal values of the probes for this genetic variation are too weak for a valid result. This could be caused by other sequence variations in close proximity to the investigated variant. The remaining signals of the assay are not influenced. |
|  | Both probes for this genetic variant show an invalid signal. This might be caused by impurities or dust particles on the MutaCHIP surface. The remaining signals of the assay are not influenced   |

### Step 5: Diagnostic report



To evaluate the results open the diagnostic Report Main. Therefore click on the button **Report**.

Additionally a .pdf document can be created or the report can be directly printed.



## 12 Trouble shooting

| Problem  | Solution   |
|--|--|
| <b>Software Message:</b> Warning! The signals of the biotin reference markers are too low. This could be a sign of a failed or missed conjugation step. Alternatively the enzyme could be degraded. The system will be stopped.            | Check enzyme and/or substrate.<br>Repeat the assay with new enzyme/ substrate  |
| <b>Software Message:</b> Warning! The signals of the DNA probes indicate a failed amplification. However, there might be a homozygous deletion of the CYP2D6 gene. Please refer to the handbook under section "Detection of *5 homozygous" | Please read paragraph 11.1   |
| <b>Software Message:</b> No error description ErrorCode -3011  | The reader is not plugged in properly:<br>Keep "Esc" pressed for 3 seconds and plug in the reader in the right manner – please refer to the user manual of the PGDx System           |
| Poor image quality   | Clean the bottom side of the MutaCHIP using a cotton swab or a cloth wet with disinfectant<br><br>Repeat the photograph (it can be necessary to repeat this procedure several times) |
| Blurred picture  | Carefully clean the camera with a cotton swab  |